

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3722958 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 22 958.3
㉑ Anmeldetag: 11. 7. 87
㉒ Offenlegungstag: 19. 1. 89

⑤ Int. Cl. 4:
C12P 21/00
C 12 N 15/00
C 12 P 19/34
// (C12P 21/00,
C12R 1:81)

DE 3722958 A1

㉓ Anmelder:
Kiefenz, Heinrich, Dr., 6900 Heidelberg, DE

㉔ Erfinder:
Kiefenz, Heinrich, Dr., 6900 Heidelberg, DE;
Nentwig, Ulrich, 4756 Wert, DE

⑭ Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung spezifischer Moleküle bzw. Molekülpopulationen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung spezifischer Moleküle bzw. Molekülpopulationen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man spezifische Eigenschaften und/oder Wechselwirkungen ausnutzt. Das erfindungsgemäße Verfahren ist hochempfindlich, es gestattet, jedes Molekül abzutrennen und zu isolieren und Molekülpopulationen mit seltenen Molekülen aufzuarbeiten und ist universell anwendbar; es gestattet in vorteilhafter Weise beispielsweise die Isolierung, Identifizierung Abtrennung, Auftrennung differentiell exprimierter Gene.

DE 3722958 A1

BEST AVAILABLE COPY

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung spezifischer Moleküle bzw. Molekülpopulationen, dadurch gekennzeichnet, daß man spezifische Eigenschaften und/oder Wechselwirkungen ausnutzt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den beteiligten Molekülen bzw. Molekülpopulationen um Desoxy-Ribonukleinsäuren und/oder Ribonukleinsäuren und/oder Proteine und/oder Peptide und/oder organische und/oder anorganische und/oder anorganisch-organische Substanzen oder Verbindungen oder dergleichen handelt.
3. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die beteiligten Moleküle eine bestimmte und/oder beliebige Struktur besitzen.
4. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die beteiligten Moleküle mindestens teilweise markiert sind.
5. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine nicht radioaktive und/oder radioaktive Markierung mit mindestens einem Marker und/oder mindestens einem Isotop handelt.
6. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine Wechselwirkung zwischen Molekülen verschiedener Substanzklassen und/oder gleicher Substanzklassen ausgenutzt wird.
7. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß bestimmte (inhärente) Moleküleigenschaften ausgenutzt werden.
8. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß auf der Molekülstruktur beruhende Eigenschaften ausgenutzt werden.
9. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Basensequenz(en) von Desoxyribonukleinsäuren und/oder von Ribonukleinsäuren und/oder von Analoga oder dergleichen ausgenutzt wird (werden).
10. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Wechselwirkung zwischen (bestimmten) Basensequenzen von DNA und/oder RNA mit gleichartigen und/oder nicht gleichartigen Molekülen ausgenutzt wird.
11. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) aus RNA-Population 1 (RNA₁) und RNA-Population 2 (RNA₂) cDNA₁ und cDNA₂ herstellt
 - b) cDNA₁ mit RNA₂ und cDNA₂ mit RNA₁ hybridisiert und
 - c) das Hybridisierungsgemisch auftrennt bzw. aufarbeitet.
12. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung nach doppelsträngigen und einzelsträngigen Molekülen erfolgt.
13. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie erfolgt.
14. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die abgetrennte einzelsträngige cDNA durch geeignete Maßnahmen kloniert wird.
15. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) die ss cDNA in ds cDNA übergeführt wird
 - b) die ds cDNA in ligierbare Form übergeführt wird und
 - c) diese cDNA ligiert und transformiert wird.
16. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die ds cDNA in "blunt end" ds cDNA übergeführt wird.
17. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ligation geeignete Vektoren ggfs. nach Dephosphorylierung eingesetzt werden.
18. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine und/oder mehrere Komponenten eines und/oder mehrerer Verfahrensschritte mindestens zeitweise und/oder mindestens teilweise in immobilisierter Form vorliegt.
19. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß verschiedene Kombinationen von Verfahrensschritten verwendet werden.
20. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne Verfahrensschritte mit Hilfe von in der Natur vorkommenden und/oder synthetischen und/oder beschriebenen Agentien, Substanzen, Katalysatoren, Enzymen und dergleichen durchgeführt werden.
21. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß eine und/oder mehrere der Eigenschaften der Wechselwirkungen in den beaufschlagten Verbindungen und/oder Methoden und/oder Verfahrensschritten verknüpft bzw. kombiniert sind.
22. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß Kompositionen und/oder Gemische und/oder verschiedene Verfahrensschrittkombinationen beaufschlagt bzw. angewendet werden.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung spezifischer Moleküle bzw. Molekülpopulationen.
Zum Stand der Technik sind die folgenden Literaturstellen zu nennen:

- Alt F. W. et al: *J. Biol. Chem.* Vol. 253,5 (1978) 1357—1370: Selective Multiplication of Dihydrofolate Reductase Genes in Methotrexate-resistant Variants of Cultured Murine Cells
- Aviv H. and Leder P.: *Proc. Acad. Sci.* Vol. 69, 6 (1972) 1408—1212: Purification of Biologically Active Globin Messenger RNA by Chromatography on Oligothymidylic acid-Cellulose
- Berger S. L. and Birkemeyer C. S.: *Biochemistry* Vol. 23 (1979) 5143—5149: Inhibition of Intractable Nucleases with Ribonucleoside-Vanadyl Complexes: Isolation of Messenger Ribonucleic Acid from Resting Lymphocytes
- Bobek L. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 83 (1986) 5544—5548: Charakterization of a female-specific cDNA derived from a developmentally regulated mRNA in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*
- Brickell P. M. et al: *Nature* Vol. 306 (1983) 756—760: Activation of a Qa/Tla class I major histocompatibility antigen gene is a general feature of oncogenesis in the mouse
- Chirgwin J. M. et al: *Biochemistry* Vol. 18, 24 (1979) 5294—5299: Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease
- Clancy M. C. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 80 (1983) 3000—3004: Isolation of genes expressed preferentially during sporulation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*
- Davis M. M. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 81 (1984) 2194—2198: Cell-type-specific cDNA probes and the murine I region: The localisation and orientation of A
- Dworkin M. B. and Dawid I. B.: *Dev. Biol.* 76 (1980) 435—448: Construction of a Cloned Library of Expressed Embryonic Gene Sequences from *Xenopus laevis*
- Dworkin M. B. and Dawid I. B.: *Dev. Biol.* 76 (1980) 449—464: Use of a Cloned Library for the Study of Abundant Poly(A) RNA during *Xenopus laevis* Development
- Hedrick S. M. et al: *Nature* Vol. 308 (1984) 149—153: Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins
- Helman L. J. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 84 (1987) 2336—2339: Molecular markers of neuroendocrine development and evidence of environmental regulation
- Hirschhorn R. R. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 81 (1984) 6004—6008: Cell-cycle-specific cDNAs from mammalian cells temperature sensitive for growth
- Kavathas P. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 81 (1984) 7688—7692: Isolation of the gene encoding the human T-lymphocyte differentiation antigen Leu-2 (T 8) by gene transfer and cDNA subtraction
- Lasky L. A. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 77,9 (1980) 5317—5321: Messenger RNA prevalence in sea urchin embryos measured with cloned cDNAs
- Lau L. F. and Nathans D.: *EMBO* Vol. 4, 12 (1985) 3145—3151: Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells
- Lee K. L. et al: *J. Biol. Chem.* Vol. 30 (1985) 16433—16438: Molecular Cloning of cDNAs Cognate to Genes Sensitive to Hormonal Control in Rat Liver
- Love J. D. and Minton K. W.: *Analytical Biochemistry* 150 (1985) 429—441 Screening of Library for Differentially Expressed Gene Using in Vitro Transcripts
- Linzer D. I. H. and Nathans D.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 80 (1983) 4271—4275: Growth-related changes in specific mRNAs of cultured mouse cells
- Matrisian L. M. et al: *Nucl. Ac. Res.* Vol. 13, 3 (1985) 711—726: Epidermal growth factor or serum stimulation of rat fibroblasts induces an elevation in mRNA levels for lactate dehydrogenase and other glycolytic enzymes
- Rothberg P. G. et al: *Mol. Cell. Biol.* Vol. 4, 6 (1984) 1096—1103: Structure and Expression of the Oncogene c-myc in Fresh Tumor Material from Patients with Hematopoietic Malignancies
- Rhyner T. A., Borbely A. A. and Mallet J.: SENSITIVE HYBRIDIZATION TECHNIQUES AS POWERFUL TOOLS IN MOLEKULAR GENETICS TO IDENTIFY BRAIN-SPECIFIC GENE PRODUCTS IN ROLE OF RNA DNA IN BRAIN FUNCTION edited by Giuditta A., Kaplan B. B. and Zomzely-Neurath C. (1986) 303—307 Martinus Nijhoff Publishing Boston/Dordrecht/Lancaster
- Rhyner T. A. et al: *J. of Neuroscience Res.* 16 (1986) 167—181: An Efficient Approach for the Selective Isolation of Specific Transcripts From Complex Brain mRNA Populations
- Roewekamp W. and Firtel R. A.: *Dev. Biol.* 79 (1980) 409—418: Isolation of Developmentally Regulated Genes from *Dictyostelium* Royer-Pokora B. et al: *Nature* Vol. 322 (1986) 32—38: Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease—on the basis of its chromosomal location
- Sargent T. D. and Dawid I. B.: *Science* Vol. 222 (1983) 135—139: Differential Gene Expression in the Gastrula of *Xenopus laevis*
- Scott M. R. D., Westphal K. H. and Rigby P. W. J.: *Cell* Vol. 34 (1983) 557—567: Activation of Mouse Genes in Transformed Cells
- St. John T. P. and Davis R. W.: *Cell* Vol. 16 (1979) 443—452: Isolation of Galactose-Inducible DNA Sequences from *Saccharomyces cerevisiae* by Differential Plaque Filter Hybridisation
- Timberlake W. E.: *Dev. Biol.* 78 (1980) 497—510: Developmental Gene Regulation in *Aspergillus nidulans*
- Vannice J. L., Taylor J. M. and Ringold G. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 81 (1984) 4241—4245: Glucocorticoid-mediated induction of α_1 -acid glycoprotein: Evidence for hormone-regulated RNA processing Williams J. G. and Lloyd M. M.: *J. Mol. Biol.* 129 (1979) 19—35: Changes in the Abundance of Polyadenylated RNA During Slime Mould Development Measured Using Cloned Molecular Hybridisation Probes
- Zimmermann C. R. et al: *Cell* Vol. 21 (1980) 709—715: Molecular Cloning and Selection of Genes Regulated in *Aspergillus* Development
- Zurita M. et al: *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 84 (1987) 2340—2344: Cloning and characterisation of a female genital complex cDNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*

Molekulare Genetik, R. Knippers, Thieme Stuttgart/New York 1982

Molekular- und Zellbiologie, P. v. Sengbusch, Springer Berlin/Heidelberg/New York 1979

Molecular Biology Of The Cell, Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Garland New York/London 1983

5 Molecular Cell Biology, Darnell J., Lodish H., Baltimore D., Scientific American 1986

Bei den Verfahren des Standes der Technik werden beispielsweise die gesamten RNA Moleküle einer oder zweier verschiedener Gewebe oder Zellarten oder zweier verschiedener Zustände der gleichen Zellart in markierte cDNAs übergeführt und Replika-Filter von genomischen oder cDNA Banken (differentiell) gescreent. Eine weitere beschriebene Methode geht von zwei cDNAs, die aus zwei verschiedenen Gesamt- oder Poly A⁺-RNAs hergestellt werden, aus. Die so gewonnenen cDNAs werden jeweils mit der "entgegengesetzten" RNA-Population hybridisiert und anschließend werden die doppelsträngigen cDNA/RNA Moleküle von den einzelsträngigen cDNA Molekülen getrennt. Mit diesen "zustandsspezifischen" cDNAs werden anschließend Gen Banken gescreent.

Die Verfahren und Methoden des Standes der Technik weisen eine ungenügende Sensitivität, Empfindlichkeit und Nachweiswahrscheinlichkeit auf. Sie gestatten lediglich die Isolierung von "häufigen" oder nur zufällig von "seltenen" spezifischen Molekülen. Insbesondere ist die Hybridisierung beim Screenen der Gen Banken konzentrationsabhängig und daher zu unempfindlich.

Demgegenüber liegt vorliegender Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu liefern, welches hochempfindlich ist, welches es gestattet, jedes Molekül zu isolieren und Molekülpopulationen mit "seltenen" Molekülen aufzuarbeiten, und welches universell anwendbar ist.

Diese Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs genannten Gattung erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man spezifische Eigenschaften und/oder Wechselwirkungen ausnutzt.

Besondere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet,

daß es sich bei den beteiligten Molekülen bzw. Molekülpopulationen um Desoxy-Ribonukleinsäuren und/oder Ribonukleinsäuren und/oder Proteine und/oder Peptide und/oder organische und/oder anorganische und/oder anorganisch-organische Substanzen oder Verbindungen oder dergleichen handelt, daß die beteiligten Moleküle eine bestimmte und/oder beliebige Struktur besitzen, daß die beteiligten Moleküle mindestens teilweise markiert sind,

daß es sich um eine nicht radioaktive und/oder radioaktive Markierung mit mindestens einem Marker und/oder mindestens einem Isotop handelt,

daß eine Wechselwirkung zwischen Molekülen verschiedener Substanzklassen und/oder gleicher Substanzklassen ausgenutzt wird,

daß bestimmte (inhärente) Moleküleigenschaften ausgenutzt werden,

daß auf der Molekülstruktur beruhende Eigenschaften ausgenutzt werden,

daß die Basensequenz(en) von Desoxyribonukleinsäuren und/oder von Ribonukleinsäuren und/oder von Analoga oder dergleichen ausgenutzt wird (werden),

daß die Wechselwirkung zwischen (bestimmten) Basensequenzen von DNA und/oder RNA mit gleichartigen und/oder nicht gleichartigen Molekülen ausgenutzt wird.

Weitere besondere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, daß man

a) aus RNA-Population 1 (RNA₁) und RNA-Population 1 (RNA₂) cDNA₁ und cDNA₂ herstellt

b) cDNA₁ mit RNA₂ und cDNA₂ mit RNA₁ hybridisiert und

c) das Hybridisierungsgemisch auftrennt bzw. aufarbeitet,

daß die Auftrennung nach doppelsträngigen und einzelsträngigen Molekülen erfolgt,

daß die Auftrennung durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie erfolgt,

daß die abgetrennte einzelsträngige cDNA durch geeignete Maßnahmen kloniert wird,

daß

a) die ss cDNA in ds cDNA übergeführt wird

b) die ds cDNA in ligierbare Form übergeführt wird und

c) diese cDNA ligiert und transformiert wird,

daß die ds cDNA in "blunt end" ds cDNA übergeführt wird,

daß zur Ligation geeignete Vektoren ggf. nach Dephosphorylierung eingesetzt werden,

daß eine und/oder mehrere Komponenten eines und/oder mehrerer Verfahrensschritte mindestens zeitweise und/oder mindestens teilweise in immobilisierter Form vorliegt,

daß verschiedene Kombinationen von Verfahrensschritten verwendet werden,

daß einzelne Verfahrensschritte mit Hilfe von in der Natur vorkommenden und/oder synthetischen und/oder beschriebenen Agentien, Substanzen, Katalysatoren, Enzymen und dergleichen durchgeführt werden,

daß eine und/oder mehrere der Eigenschaften der Wechselwirkungen in den beaufschlagten Verbindungen

und/oder Methoden und/oder Verfahrensschritten verknüpft bzw. kombiniert sind,

daß Kompositionen und/oder Gemische und/oder verschiedene Verfahrensschrittkombinationen beaufschlagt bzw. angewendet werden.

Die Erfindung ermöglicht in sprunghaft gesteigerter Weise die Isolierung und/oder die Identifizierung spezifischer Moleküle bzw. Molekülpopulationen.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet besondere Vorteile bei der Isolierung/Identifizierung differentiell exprimierter Gene.

In den Rahmen der Erfindung fallen beispielsweise: Mehrfachhybridisierungen mit gleichen oder verschiedenen RNAs, Hybridisierungen von cDNAs mit Poly A⁺-RNAs zur Isolierung von Poly A⁻- und regulatorischen RNAs, Interaktionen mit Proteinen, Hybridisierungen von DNAs mit DNAs und RNAs mit RNAs. Unter Molekülpopulationen versteht man ein Gemisch von Molekülen verschiedener Struktur, Sequenz und ggfs. Länge, wobei jedes Einzelmolekül mindestens einmal vorhanden ist.

So beschreibt die Fig. 1 ein Schema eines der möglichen erfindungsgemäßen Verfahren und Verfahrensanwendungen. Dabei wird aus zwei verschiedenen Ausgangsmaterialien (z. B. stimulierte und unstimulierte, wachsende und ruhende Zellen, alte und junge Zellen, differenzierte und nicht-differenzierte Zellen oder Gewebe oder Organe oder dergleichen) mit (+) und (-) zur Unterscheidung gekennzeichnet) mittels einer geeigneten Methode (beispielsweise GTC-Methode (Guanidinthiocyanat- (Guanidin-Rhodanid)Methode)) RNA gewonnen. Sodann wird die RNA entweder getrennt durch Chromatographie an einer Oligo dT-Säule oder sonstwie aufgetrennt und dann mit entsprechendem Enzym (Reverse Transcriptase) in cDNA übergeführt (cDNA = complementary, copy DNA).

Es ist auch möglich und manchmal vorzuziehen, direkt aus total RNA cDNA herzustellen.

Diese cDNA wird mit "anderer" ("entgegengesetzter" RNA) oder einer sonstigen abzuziehenden Molekülpopulation zusammengebracht unter geeigneten Bedingungen (hybridisiert). Das entstehende Gemisch von cDNA-RNA-Hybriden und einzelsträngiger cDNA wird auf einer Hydroxylapatit-Säule aufgetrennt und mindestens die ss-cDNA gewonnen.

Diese einzelsträngige (ss) cDNA wird in doppelsträngige (ds) cDNA übergeführt mit geeigneten Mitteln, wie Polymerase oder Reverse Transcriptase. Die Enden dieser ds-cDNA werden in ligierbare Form übergeführt ("End-Polishing"), beispielsweise mittels T4 DNA Polymerase und/oder S1 Nuclease und/oder Mung Bean Nuclease oder dergleichen. Die so aufbereitete ds-cDNA wird in einen geeigneten Vektor (Plasmid, Phage, Cosmid, Virus, Shuttle Vektor oder dergleichen, der gegebenenfalls in geeigneter Weise vorbereitet wurde, wie Dephosphorylierung, Linkeraddition etc.) ligiert und in kompetente Zellen, eigens vorbereitete und/oder modifizierte E. coli Stämme oder dergleichen transformiert. Die transformierten Zellen werden unter geeigneten und Selektionsbedingungen gezüchtet (ggf. auf Platten) und die Kolonien, Plaques oder sonstige resultierende Zellen (nach Selektion oder mittels markierter Proben) identifiziert und isoliert.

Die Fig. 2 zeigt in schematischer Form die Abläufe zur Isolierung von Poly A⁻ und regulatorischen RNAs. Dabei wird, wie beim Schema der Fig. 1 aus RNA (ss) cDNA hergestellt. Nach Hybridisierung mit "anderer" RNA und HAP-Säulen-Trennung wird die (ss) cDNA mit "anderer" oder "gleicher" Poly A⁺ RNA hybridisiert. Diese Hybridisierung kann auch gleichzeitig oder unmittelbar anschließend an die erste Hybridisierung erfolgen.

Danach erfolgt (wieder) eine Auftrennung an einer Hydroxylapatit-Säule.

Die so isolierten (+) bzw. (-) cDNAs entsprechen Poly A⁻ und regulatorischen RNAs und dergleichen, die zur weiteren Charakterisierung wie gemäß Schema der Fig. 1 weiter bearbeitet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegt weiterhin, auf einer oder mehreren Stufen die an diesem Punkt vorhandenen Moleküle und dergleichen mit Reagenzien und/oder Substanzen und/oder Methoden und/oder Mitteln zu beaufschlagen, dergestalt, daß eine und/oder mehrere Molekülspezies und/oder Moleküle und/oder Molekülpopulationen spezifisch in Wechselwirkung treten bzw. modifiziert bzw. umgewandelt werden. Beispielsweise können DNA- und/oder RNA-Moleküle und/oder Proteine und dergleichen methyliert, hydrolysiert, gespalten, abgebaut, synthetisiert und dergleichen werden. Diese Beaufschlagung ist gegebenenfalls Molekül-, Molekülstruktur-, Sequenz-, Nukleotid-, Primärstruktur-, Sekundärstruktur-, Tertiärstruktur-, Quartärstruktur-spezifisch, wie beispielsweise single-strand-spezifische Binde-Proteine (RNA und/oder DNA, ss und/oder ds), RNA spezifische Hydrolyse für Einzel- und/oder Doppelstränge, DNase(n) (einzel- und/oder doppelstrang-spezifische), Methylasen, modifizierende Enzyme, interkalierende Agentien, fragmentierende Agentien, modifizierende Agentien und/oder (Teil-) Kombinationen dieser Agentien und/oder dergleichen. Weiterhin liegt es im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf einer oder mehreren Stufen unspezifische und/oder spezifische Synthesen zu bewirken, beispielsweise bei der Herstellung des ersten und/oder zweiten DNA-Stranges und/oder bei der Herstellung eines ersten und/oder zweiten RNA-Stranges und dergleichen. Dies kann durch spezifisches und/oder unspezifisches "Primer" und/oder durch Einstellung/Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen bewirkt werden. Damit können spezifische und/oder unspezifische (Sub-) Populationen hergestellt und/oder angereichert werden. Diese Molekülpopulationen und/oder Gemische können dann zur spezifischen Auftrennung und/oder Umsetzung entsprechend, beispielsweise wie oben ausgeführt beaufschlagt und/oder bearbeitet werden.

Die Fig. 3 stellt in beispielhafter schematischer Form die Wechselwirkungen zwischen einer Moleküllart, beispielsweise einem Protein und/oder einer DNA und/oder einer RNA und einer anderen Moleküllart, beispielsweise DNA und/oder RNA, sowie Folgeschritte dar. Es können auch Molekülpopulationen dementsprechend erfindungsgemäß eingesetzt werden.

Dabei wird Gesamt-DNA in Fragmente zerlegt (Restriktionsenzyme, chemisch, mechanisch, physikalisch etc.) und mit einem völlig oder partiell aus Zellen, Gewebe oder dergleichen aufgereinigten Protein beaufschlagt. Nach entsprechender Inkubation werden die aufgrund von Wechselwirkungen entstehende DNA-Protein-Komplexe von freier DNA abgetrennt. Aus den DNA-Proteinkomplexen wird die DNA gewonnen und nach Überführung in ligierbare Form, wie beispielsweise oben ausgeführt oder auf andere geeignete Weise, in eine Ligation mit einem geeigneten Vektor eingebracht, in kompetente Zellen transformiert, ausplattiert und in geeigneter Weise isoliert. Eine und/oder mehrere Komponenten dieser Abfolge können auch in immobilisierter Form eingesetzt werden.

Durch Kombination der verschiedenen Verfahrensschritte und/oder Sequenzen bzw. Teilen davon ist es beispielsweise möglich, bestimmte cDNA-"Gene" zu identifizieren und /oder zu isolieren ggfa. genomische Sequenzen zu identifizieren und/oder zu isolieren. Proteine herzustellen (Expressions-Systeme) und weitere interagierende DNA- und/oder RNA-Sequenzen zu isolieren. Dabei können beispielsweise auch Antikörper

(gegen Proteine und/oder Peptide und/oder DNA und/oder RNA) eingesetzt werden.

Auch "differentialles Foot-Printing" kann durch eine Kombination von erfindungsgemäßen Schritten durchgeführt werden.

Eine mögliche (Weiter-) Verarbeitungsmethode für gewonnene cDNA ist im Folgenden beschrieben. Im Folgenden ist in schematischer Weise die Reaktionsabfolge zur Isolierung und/oder Identifizierung von DNA- und/oder RNA-Sequenzen, welche "Open Reading Frames (ORFs)" darstellen, geschildert. Dabei wird beispielsweise eine λ -Phagen DNA mit einer "Frame-Shift-Mutation" in einem geeigneten Gen (z. B.: das lac Z Gen) versehen. Eine der oben gewonnenen cDNA-Populationen wird mit diesem Vektor ligiert. Dabei hebt statistisch jedes 18te ORF die Mutation wieder auf. Dann wird in einen geeigneten Wirt transformiert und bei geeigneter Temperatur z. B. auf Minimalmedium Platten, welche als einzigen Zucker Lactose enthalten, gezüchtet, wobei nur Hybridmoleküle, die die "Frame-Shift-Mutation restauriert haben, enthaltende Zellen wachsen können. Eine Induktion der Phagen liefert Plaques zur Isolierung entsprechender Klone.

Zur Erläuterung der biochemischen Grundoperationen, Begriffe und Anglizismen wird auf die zum Stand der Technik angegebene Literatur und dort zitierte Literatur, sowie auf angegebene Lehrbücher verwiesen.

Die folgenden Beispiele stellen keine Einschränkung der vorliegenden Erfindung dar.

Beispiele

Nick Translation

Materialien: Nick-Translations Puffer 10x:

0,5 M Tris-HCl pH 7,5
100 mM MgCl
10 mM DTF

DNA Polymerase I E. Coli
DNase 10-mg/ml
Nukleotide: dATP, dTTP, dGTP, α^{32} PdCTP
NT-Mix: je 0,5 M dATP, dTTP, dGTP, Biogelsäule EDTA 250 mM

Gesamtvolumen 20 μ l
— 5 μ l α^{32} PdCTP in Speed Vac eintrocknen
— 2 μ l NT-Puffer zugeben
— 3 μ l Nucleotid-Mix zugeben
— X μ l DNA zugeben (Plasmide 0,5 μ g, Genomisch 1–2 μ g)
— X μ l H₂O zugeben
— 1 μ l DNA-Polymerase I zugeben = 10 U
— 1 μ l DNase 1 : 100 000 zugeben
— mischen
— 1,5–2 h bei 15° lassen
— 2,4 μ l EDTA 250 mM zugeben
— auf Biogelsäule auftragen
— Fraktionen à 400 μ l nehmen
— je 1 μ l im Eppendorf Tscherenkov Strahlung messen

Nucleotid-Mix: je 0,5 M dATP, dTTP, dGTP
DNase 10 mg/ml 1 : 100 000 in H₂O verdünnt

Reparatur der ds DNA Enden ("End-polishing")

Materialien: T 4 DNA Polymerase 1 U/ μ l

— 100 μ l 2ter Strang Synthese Reaktion
— 8 μ l T 4 DNA Polymerase = 8 U
— bei 15° > 6 Std. inkubieren
— 0,1 Vol. LiCl 4 M zugeben
— 3 Vol. EtOH
— bei –20° ON fällen
— abzentrifugieren 20 min. Eppendorf
— Pellet trocknen lassen
— in 40 μ l H₂O aufnehmen

OS 37 22 958

c-DNA Synthese 1ter Strang

Materialien:

Tris-HCl pH 8,5 2 M
MgCl₂ 0,1 M
NaCl 0,5 M

Nucleotide: dATP, dTTP, dGTP, dCTP $\alpha^{35}\text{SdCTP}$
Actinomycin D
RNAsin 40 u/ μl
DTT
Random Primer pd(N)₆
Reverse Transcriptase

HCl 1 M
NaOH 0,2 M
NaAc 0,5 M
SDS 1%

Biogelsäule
Szintillationscocktail
PAA-Harnstoff Gel

Reaktions Volumen 100 μl :

- 2,5 μl Tris-HCl pH 8,5	2 M	50 mM
- 6 μl MgCl ₂	0,1 M	6 mM
- 12 μl NaCl	0,5 M	60 mM
- 1 μl dATP	100 mM	1 mM
- 1 μl dTTP	100 mM	1 mM
- 1 μl dGTP	100 mM	1 mM
- 1 μl dCTP	1 mM	10 mM
- 1 μl Actinomycin D	10 mg/ml	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 2,5 μl RNAsin	40 u/ μl	1 u/ μl
- 2 μl DTT	1 M	20 mM
- 10 μl Random Primer	0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 25 μl $\alpha^{35}\text{SdCTP}$		
- 10 μl Reverse Transkriptase	200 U/ μl	200 U/ μgRNA
- 25 μl RNA	100 μg total RNA bzw.	10 μg PolyA ⁺
- 2 Std. 42°		
- 100 μl NaOH 0,2 M zugeben		
- 25 min. 70° (Hydrolyse)		
- auf Eis kurz abkühlen		
- 20 μl HCl 1 M zugeben		
- 22 μl NaAc 2 M zugeben		
- 24 μl SDS 1% zugeben		
- 2 μl in Eppendorf geben		
- 20 μl Szintillationscocktail zugeben		
- gut mischen und im Counter mit offenem Fenster messen		
- 3-5 Mio. cpm auf 6% 0,5 mm PAA-Harnstoff Gel checken		
- Rest der Reaktion auf Biogel-Säule auftragen		
- 10 Fraktionen à 400 μl nehmen		
- je 10 μl + 100 μl Cocktail messen		
- Fraktionen bei -20° aufheben		
vor weiterer Verwendung:		
- Interessante Fraktionen in Speed Vac auf 100 μl einengen		
- 0,1 Vol LiCl 4 M zugeben		
- 2,5 Vol EtOH zugeben		
- ON bei -20° fällen		

c-DNA Synthese 2ter Strang

Materialien: second strand buffer 10 x :
Random Primer pd(N)₆

Nucleotide
T4 DNA Ligase
E. Coli Polymerase I
ATP 10 mM

5

Reaktionsvolumen 100 µl:

- 50 µl Einzelstrang c-DNA
- 2 µl Primer = 200 ng (100 ng/µl)
- 10 — 10 µl 10× ss-Puffer
- 18 µl H₂O
- anneal 2 Std. bei 56°
- kurz auf Eis abkühlen
- 2 µl ATP 10 mM
- 15 — je 2 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP 100 mM zugeben
- 6 µl Ligase
- 4 µl Polymerase
- bei 15° ON inkubieren

20 die Reaktion wurde direkt zum Reparieren der Enden eingesetzt

Ligationen:

Materialien: Ligase Puffer 10×:

25

ATP 2 mM
T4 DNA Ligase

Reaktionsvolumen: 20—100 µl abhängig von den zu ligierenden Enden, sowie der DNA Menge

30 z. B. für 20 µl:

- 2 µl Ligase Puffer 10×
- 2 µl ATP 2 mM
- x µl DNA ca. 0,1—0,5 µg
- 35 — y µl H₂O
- 1 µl T4 DNA Ligase = 10 U
- bei 15° mindestens 18 Std. ligieren

Reaktionsmischung kann direkt in die Transformation eingesetzt werden

40

Southern Blot:

- übliches Agarose Gel mit EtBr
- nach Lauf normal photographieren
- 45 — Gel in 0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl 30 min. bei RT unter leichtem Schütteln lassen
- ebenso 30 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 lassen
- Filter vorbereiten:
- Seite B markieren
- mit Bidest benetzen
- 50 15 min. in 10× SSC lassen
- Blot wie üblich aufbauen
- mindestens 16 Std. blotten
- Blot wie üblich abbauen
- kurz in 0,4 M NaOH spülen
- 55 — in 0,2 M Tris-HCl pH 7,5—2× SSC
- Lufttrocknen
- bei 80° 30 min. backen

Double strand sequencing:

60

- 2 µl DNA supercoiled in TE (Mini Prep DNA possible??)
- add 20 µl 0,2 M NaOH, 0,2 M EDTA
- 5 min. RT
- add 2 µl 3 M NaAc pH 4,8 (Lösung C Plasmid Prep)
- 65 — add 2 Vol. EtOH 30 min. 20°
- [wash 2 times with 70% etOH]
- spin Eppendorf 20 min. full speed
- dry Pellet speed vac

- dissolve Pellet in 10 µl Primer Mix + 2,5 µl H₂O
- anneal 60 min. 60°
- cool down to RT (ca. 30 min.)
- add 3 µl Mix to 2 µl "A", "C", "T", "G" solution
- 20 min. 37°
- add 2 µl chase sol.
- 20 min. 37°
- add 4 µl stop sol.
- 2 min. 95°
- load 3 µl on Gel

5

10

DNA – RNA Hybridisierung in Kapillaren

Materialien: 1ter Strang c–DNA
Überschuß RNA
50 µl Mikropipetten
Hybridisierungspuffer:

15

NaPi pH 6,8 120 mM
NaCl 820 mM
EDTA pH 5,2 10 mM
Poly U 10 µl/ml

20

- gesamte Ausbeute einer 1ter Strang c–DNA Synthese in 20 µl Hybridisierungspuffer aufnehmen
- ca. 200 µg total RNA in 30 µl Hybridisierungsp. aufnehmen
- c–DNA Lösung zur RNA Lösung geben
- 20 min. auf 70° erhitzen
- in Kapillare einschmelzen
- kontrollieren ob die Kapillaren an beiden Enden vollständig zugeschmolzen sind unter dem Binokular
- eventuell Zuschmelzen wiederholen
- bei 60° mindestens 100 Std. hybridisieren

25

30

Anschließend HAP-Säule

Biogel-Säule

35

Materialien: Biogel Puffer:
5 mM Tris–HCl pH 7,8
5 mM NaCl
Biogel A-5 m 200–400 mesh (BIO–RAD)
Pasteurpipette
Glaswatte silanisiert (Serva)

40

- ein wenig Glaswatte in die Pipette stopfen
- Biogel auffüllen
- möglichst ohne Luftblasen
- wenn Biogel sich gesetzt hat, nachfüllen
- letztlich sollte das Gelbett bei der Einschnürung der Pipette sein
- mit Biogel Puffer äquilibrieren 2–3 ml
- Puffer ganz einsinken lassen
- Probe auftragen im gleichen Volumen der Fraktionen
- entsprechende Anzahl Fraktionen nehmen

45

50

Hydroxylapatit-Säule (HAP)

Materialien: Hydroxylapatit SC Serva Suspension 10–20% reinst
ummantelte Säule
Elutionspuffer Herstellen 1 M NaPi ungepuffert
[1 Mol Na₂HPO₄ · 2 H₂O (MW 177,99) + 1 Mol NaH₂PO₄ · H₂O (MW 137,99)/2 l]
daraus
PB 10 = 10 ml 1 M NaPi, pH 6,8 mit H₃PO₄
PB 120 = 120 ml 1 M NaPi, pH 6,8 mit NaOH
PB 400 = 400 ml 1 M NaPi, pH 6,8 mit NaOH
alle Puffer ohne SDS
Szintillationscocktail

55

60

65

- die Säulen auf 20° temperieren
- HAP einfüllen

- setzen lassen und nachfüllen bis Säulenbett ca. 4 cm hoch
- Oberfläche nicht trockenwerden lassen PB 10 aufgeben
- mit 2–3 Säulenvolumen PB 10 äquilibrieren
- die Hybridisierungsprobe mit H_2O 1 : 10 verdünnen
- 5 — die gesamten 500 μ l in die Säule einsinken lassen
- noch einmal 500 μ l PB 10 dazugeben
- jeweils 1 ml Fraktionen nehmen
- nach 10 Fraktionen PB 120 aufgeben
- erneut 10 Fraktionen nehmen
- 10 — dann 10 Fraktionen PB 400
- jeweils 50 μ l aller Fraktionen mit je 500 μ l Cocktail bei offenem Fenster messen
- die Fraktionen, die die Einzelstränge enthalten in der Speed Vac auf 250 μ l einengen
- die DNA kann direkt zur Synthese des zweiten Stranges eingesetzt werden

15

Sequenziergel

- Materialien: 2 Glasplatten 40 x 20 cm
 Spacer 0,2 mm stark
- 20 Kamm 0,2 mm
 Laufpuffer Tris–Borat 10x:
 89 mM Tris–Base
 89 mM Borsäure
 2 mM EDTA
- 25 Probenpuffer: TBE 1x
 90% Formamid
 0,2% Xylene Cyanol
 0,2% Bromphenolblau
- 30 0,4% Orange G
- Dimethyldichlorosilan
 Harnstoff
 Acrylamid
 35 Bisacrylamid
 Ammoniumpersulfat
 N,N,N,N-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)

- Acrylamid Stock ansetzen:
- 40 30 g Acrylamid
 1 g Bisacrylamid
 pro 100 ml Wasser
- 25% Ammoniumpersulfat-Lösung ansetzen
- Glasplatten sehr gut reinigen (EtOH)
- 45 — Glasplatte mit "Ohren" auf einer Seite silanisieren
- einer Glasplatte an 3 Seiten Spacer aufliegen
- silanierte Platte mit silanisierter Seite innen aufliegen
- mit Klemmen zusammenhalten
- evtl. mit Agarose abdichten
- 50 — Gel in Saugflasche vorbereiten:
- 22,5 g Harnstoff
- 20 ml H_2O
- 10 ml Acrylamid Stock
- 5 ml TBE 10x
- 55 — Gel unter Erwärmen lösen
- mit Wasserstrahlpumpe entgasen
- 100 μ l Ammoniumpersulfat zugeben
- 20 μ l TEMED zugeben
- kurz mischen
- 60 — Gel zügig mit 50 ml Pipette zwischen die Glasplatten gießen
- Kamm einstecken
- waagrecht hinlegen und Polymerisation abwarten
- nach polymerisieren unteren Spacer vorsichtig entfernen
- Gel in Apparatur einspannen
- 65 — Laufpuffer 1x auffüllen
- Luftblasen unter dem Gel entfernen
- vorsichtig den Kamm herausziehen
- Gel 2–3 h bei 2000 V vorlaufen lassen

- durch die Sequenzierreaktion vorbereitete Proben auftragen mit einer Hamilton Spritze vor jedem Probenauftrag die entsprechende Geltasche mit Puffer ausspülen
- 2000 V anlegen
- nach ca. 3 h Röntgenfilm in der Dunkelkammer auflegen
- Film am nächsten Tag entwickeln

5

Genomischer DNA Prep. aus gefrorener Leber

Materialien: flüssiger N₂
Mörser mit Pistill
RNAse 10 mg/ml
Phenol gesättigt mit TE + 0,1%

10

Hydroxychinoline

TE
LiCl 4 MM
Isopropanol
Proteinase K 10 mg/ml
SDS 10%
Puffer: 1/2 TE + 1/2 EDTA 0,2 M und 0,3 M NaCl

15

- Leber im Mörser in flüssigem N₂ zu Staub zerkleinern mit gekühltem Pistill
- Staub mit gekühltem Löffel in 20 ml Puffer geben
- in Falcon Tubes füllen
- 200 µl RNAse zugeben
- mischen
- 2 ml 10% SDS zugeben
- 30 min. bei RT rühren
- 2 ml Proteinase K zugeben
- bei 4° Schütteln bis Lösung klar geworden ist (mind. ON)
- evtl. nochmals Proteinase zugeben
- Phenol Extraktion je 2—3 Std.
- Phasen trennen durch Zentrifugation Sorvall SS 34 4 min 2500 rpm
- Phenolphase (unten) vorsichtig entfernen
- 2—3mal wiederholen
- zentrifugieren SS 34 20 min. 10 000 rpm
- Überstand gegen TE dialysieren zunächst 1 Std. bei RT, danach
- ON im Kühlraum wobei ein Faktor von 1000 unbedingt erreicht werden sollte
- 0,1 Vol. LiCl 4 M zugeben
- 0,6 Vol. Isopropanol zugeben
- bei RT ON schütteln
- abzentrifugieren SS 34 20 min. 4000 rpm 4°
- 500 µl TE zugeben und ON bei 4° lösen lassen

25

30

35

40

Formaldehyd-Gel

45

Materialien: Agarose Typ IV
Gene Screen Puffer 10×:
120 mM Tris—HCl
60 mM NaAc
3 mM EDTA
pH 7,4
Formaldehyd 37%
Formamid
Ladepuffer
EtBr (10 mg/ml)

50

55

Vorbereitung Gel

Gesamtmenge 100 ml:

60

- 1 g Agarose Typ IV
- 73 ml H₂O
- 10 ml Gene Screen Puffer 10×
- unter erhitzen lösen
- etwas abkühlen lassen
- 16,2 ml Formaldehyd zugeben

65

— Gel gießen

Vorbereitung Probe

- 5 — RNA 30 min. bei 13 krpm abzentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Speed Vac trocknen
- Pellet in Mix aufnehmen je nach Slotgröße
- bei RT schütteln bis Pellet gelöst
- 10 — 10 min. auf 70° erhitzen
- Ladepuffer zugeben nach Slotgröße
- Gel laden
- bei 20 V 24 Std. laufen lassen.
- 1 min. in 15 µl EtBr/1 H₂O färben
- 15 — photographieren

GTC—RNA—Präparation

Materialien: PBS

- 20 GTC:
 - 50 g Guanidinthiocyanat
 - 0,5 g n-Lauryl-Sarkosin
 - 2,5 ml 1 M NaCl
 - 0,7 ml 14 M β-Mercaptoethanol
- 25 0,33 ml 30% Antifoam
- pH 7 mit NaOH einstellen
- durch Faltenfilter gießen
- filtrieren durch Millipore Millex GS 0,22 µm
- im Dunklen aufheben
- 30 CsCl-Kissen:
 - 7,5 M CsCl
 - 0,1 M EDTA pH 7,2
 - 5 mM β-Mercaptoethanol
 - Depp H₂O: 0,1% Diethylpyrocarbonat autoklavieren
- 35 LiCl 4 M
- EtOH
- Zellen bei 4° abzentrifugieren
- Pellet in sterilem PBS aufnehmen
- 40 — erneut abzentrifugieren (20 min. 2600 rpm)
- nochmals waschen
- Pellet in GTC aufnehmen ca. 6 Vol.
- augenblicklich heftig vortexen
- in Polyallomer Tubes für SW 40 Rotor 6 ml steriles CsCl-Kissen füllen
- 45 — je 6 ml der Zellsuspension geben
- mit GTC austarieren
- 20 Std. bei 31 krpm 20° zentrifugieren
- überstand vorsichtig mit gebackener Pasteurpipette abnehmen
- bis ca. 1 cm über den Boden des Tubes
- 50 — Rest abgießen
- Pellet trocknen lassen
- 450 µl steriles Depp—H₂O zugeben
- bei 4° ON schütteln lassen
- in gebackene Eppendorf überführen
- 55 — 0,1 Vol. LiCl 4 M zugeben
- 2 Vol Ethanol zugeben
- bei -20° aufnehmen

Mini-Prep

- 60 Materialien: Phenol mit NaAc 0,3 M pH 5 gepuffert
- Extraktionspuffer:
 - 0,3 M NaAc pH 5
 - 10 mM EDTA
- 65 0,2% SDS
- PBS
- Chloroform
- LiCl 4 M

- zentrifugieren je nach Zellart (z. B. 15 min 2000 rpm)
- waschen in 2 ml PBS
- Überstand abnehmen
- 1 ml 70° heißes Phenol zugeben
- vortexen 5
- 200 µl Extraktionspuffer zugeben
- vortexen
- 1 ml Chloroform zugeben
- vortexen
- 2 min 10 krpm zentrifugieren
- wäßrige Phase in neues Eppendorf überführen 10
- nochmals extrahieren
- 1 Vol 4 M LiCl zugeben
- bei 4° ON fällen

Northern Blot 15

a) Blotten

- Normales Formaldehyd Gel
- nach Photo 1/2 Std. in H₂O entfärben 20
- Filter vorbereiten wie Southern
- normalen Blot aufbauen
- mind. 16 Std. blotten
- Filter in 2 × SSC kurz waschen
- Lufttrocknen 25
- bei 80° 2 Std. backen

b) Hybridisierung

- bei 37° in Church-Puffer 2—3 Std. vorhybridisieren 30
- 500 000—1 000 000 cpm/ml der Probe 10 min. bei 95° kochen
- bei 37° ON in Church-Puffer hybridisieren
- heiße Probe abgießen (Ausguß)
- 3 × 5 min. mit warmer Waschlösung bei 37° waschen
- 1 Std. waschen 35
- naß exponieren bei -70°
- nach einer Nacht Film entwickeln
- Signal besichtigen

Herstellung Kompetenter E. Coli-Zellen 40

Unter Kompetenten Zellen versteht man Bakterien-Zellen, die eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für exogene DNA besitzen. Dies beruht auf Änderungen in der Struktur der Membranen, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist. Erreicht wird dies durch Behandlung der Zellen mit anorganischen Ionen. 45

Erforderliche Materialien:

- 1 Kolonie E. Coli HB 101 oder 7118
- LB-Vollmedium
- 100 mM CaCl₂ (4°) 50

Durchführung

1 Tag:

- animpfen von 5 ml LB einer Kolonie 55
- inkubieren bei 37° ON

2 Tag:

- inokulieren von 200 ml LB mit 1 ml der ON Kultur 60
- bei 37° bis zur OD 600 = 0,2 wachsen lassen
- abzentrifugieren bei 4°, Sorvall GSA 6000 rpm 10 min
- ab hier alle Schritte im Kühlraum durchführen
- abgießen des Überstandes
- aufnehmen des Pellets in 100 ml CaCl₂ 65
- resuspendieren
- 20 min auf Eis lassen

- abzentrifugieren wie oben
- abgießen des Überstandes
- aufnehmen in 5 ml CaCl_2
- resuspendieren
- 5 — in 400 μl Aliquots aufteilen
- sofort in flüssigem N_2 einfrieren
- bei -70° aufheben

Transformation Kompetenter Zellen mit Plasmid DNA

- 10 Unter Transformation versteht man die Aufnahme von Fremd-DNA durch E. coli Zellen. Mit Hilfe von eingeführten Resistenzgenen kann man transformierte Zellen selektionieren.

Erforderliche Materialien:

- 15 Kompetente Zellen s. DNA 1
Plasmid DNA
Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum

Durchführung

- 20 1 Tag:

- 1 Aliquot Kompetente Zellen direkt in ein Eisbad geben
- im Eis auftauen lassen ca. $\frac{1}{2}$ Std.
- 25 — 1 μg Plasmid DNA zugeben in nicht mehr als 5 μl Volumen
- gut durchmischen
- 30 min auf Eis lassen
- 2 min 37°
- 2 min auf Eis lassen
- 30 — 600 μl LB zugeben
- 60 min bei 37°C lassen
- 30 sowie 300 μl auf je 1 LB-Platte mit Antibiotikum ausplattieren
- bei 37° ON inkubieren (umgedreht)

- 35 2 Tag:

- Kolonien je Platte zählen
- Transformationseffizienz bestimmen als: Kol/ μg DNA

Plasmid Mini-Präparation

40 Die Mini-Präparation von Plasmiden dient dazu in relativ kurzer Zeit eine größere Anzahl unterschiedlicher Plasmide zu extrahieren, und analysieren zu können. Dabei wird in Kauf genommen, daß die DNA recht unsauber ist. Die Reinheit reicht jedoch aus, um z. B. einen Restriktionsverdau durchzuführen.

Erforderliche Materialien:

- 45 24 Plasmid enthaltende Kolonien
LB-Medium
Isopropanol
50 1% Agarose Gel
24 sterile große Reagenzgläser mit Kappen

Lösung A:

- 50 mM Glukose
33 25 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA pH 8,0

Lösung B:

- 200 mM NaOH
60 1% SDS

Lösung C:

- 3 M NaAc pH 4,8

TE:

- 63 10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA pH 7,5

alle Lösungen autoklavieren, bis auf Lösung A

Durchführung

1 Tag:

5

- animpfen von 2 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Kolonie
- im Reagenzglas ON bei 37° inkubieren

2 Tag:

10

- 1,5 ml jeder Kultur in Eppendorf überführen
- zentrifugieren 2 min mit Höchstgeschwindigkeit
- Überstand dekantieren
- Pellet in 100 µl Lösung A aufnehmen
- gut resuspendieren
- 200 µl Lösung B zugeben
- gut durchmischen
- 5 min auf Eis lassen
- 170 µl Lösung C zugeben
- gut durchmischen
- 15 min auf Eis lassen
- 10 min abzentrifugieren
- 400 µl Überstand in frisches Eppendorf überführen
- 400 µl Isopropanol zugeben
- gut durchmischen
- 15 min bei -20° lassen
- 10 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen
- Pellet 5 min in Speed Vac trocknen
- Pellet in 200 µl TE aufnehmen
- 10 µl auf ein Agarose Gel auftragen (s. Agarose Gel)
- bei -20° aufheben

15

20

25

30

Restriktionsenzym-Verdau

35

Mit Hilfe eines Verdauens mit Restriktionsenzym(en) charakterisiert man z. B. Plasmide und deren Inserts. Man erhält so eine charakteristische Restriktionsfragment-Kartierung, indem man die erhaltenen Fragmente auf einem Gel auftrennt und in der Regel mittels eines interkalierenden Farbstoffes unter UV-Licht sichtbar macht.

Erforderliche Materialien:

40

Entsprechenden Enzympuffer 10fach konzentriert (10 x) Bdest Wasser
DNA ca. 0,5 µg pro Verdauung
Restriktionsenzym ca. 2–5 U/µg DNA

45

Durchführung

1 Tag:

50

Allgemein:

- entsprechende DNA-Konzentration einstellen ca. 0,5 µg/1–2 µl
- zusammenpipettieren in Eppendorf-Reaktionsgefäß: (Endvolumen: 10 µl)
- 1 µl Enzympuffer 10 x
- 1–2 µl DNA
- 6–7 µl H₂O
- 1 µl Enzym
- Enzym zuletzt zugeben und so kurz wie möglich aus Gefrierschrank holen
- bei 37° 60 min inkubieren
- Agarosegelelektrophorese durchführen

55

60

bei Plasmid Mini-Präparation:

- 10 µl Mini-Prep DNA (ohne Konzentrationsbestimmung)
- 1,5 µl Enzym-Puffer 10 x
- 1 µl RNase (gekocht 10 mg/ml)
- 1 µl H₂O
- 1,5 µl Enzym
- 90 min bei 37° inkubieren

65

— Agarosegelelektrophorese

Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese in Agarose-Gelen dient in der Regel dazu, DNA oder auch RNA ihrer Größe nach aufzutrennen. Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente wird die Agarose-Konzentration gewählt. Je kleiner die Stücke, desto höher die Konzentration. Übliche Konzentrationen bewegen sich zwischen 0,8 und 2% Agarose. Die Auftrennung erfolgt bei einem pH von 7,8 in einem elektrischen Feld bei 60–80 V. Die DNA-Fragmente wandern zu Anode.

Erforderliche Materialien:

Agarose Typ IV
Kammer zum Gießen des Gels mit Kamm
Laufkammer
Power Supply
Laufpuffer Tris-Acetat 10 x:
400 mM Tris-Base
50 mM NaAc
10 mM EDTA
mit Essigsäure auf pH 7,8 einstellen

Probenpuffer:
Tris-Acetat Puffer 1 x

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylene Cyanol
60 mM EDTA
50% Glycerin

Ethidiumbromid 10 mg/ml

Durchführung

- Erforderliche Menge Agarose abwiegen
- für 100 ml 1% Gel 1 g Agarose alle Angaben für 100 ml Gel
- 10 ml 10 x Puffer zugeben
- auf 100 ml mit Bidest auffüllen
- unter Erwärmen lösen
- 5 µl EtBr zugeben
- Kamm in die Gießkammer einsetzen
- gelöstes Gel in die Kammer gießen
- erstarren lassen
- 1 l Laufpuffer (1 x) ansetzen
- 50 µl EtBr zugegeben
- Kamm vorsichtig entfernen
- Gel in die mit Puffer gefüllte Kammer legen
- Gel 1–2 cm mit Puffer bedecken
- Probe mit 4 µl Probenpuffer versetzen
- kurz zentrifugieren
- Probe vorsichtig in die Taschen laden
- 60–80 V Spannung anlegen
- Laufrichtung von – nach +
- nach 2–3 Std. Polaroidphoto anfertigen

Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung versetzt uns in die Lage die Reihenfolge der vier Nucleotide in einer beliebigen DNA zu bestimmen. Hierzu gibt es unterschiedliche Methoden. Die beiden meist angewendeten sind chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert, sowie die Kettenabbruchmethode nach Sanger.

Die hier verwendete Kettenabbruchmethode basiert auf dem Einbau von Nucleotidanalogen und dem daraus resultierenden Abbruch der Kette, die durch die Polymerase synthetisiert wird. Als Nucleotidanaloge werden 2'-3'-Dideoxynucleotide eingesetzt. Die Markierung erfolgt mittels eines ³²S-Nucleotids (in diesem Falle dCTP). Anschließend erfolgt die Auftrennung der erhaltenen Fragmente in einem Polyacrylamid-Gel. Das entstehende Bandenmuster wird durch einen Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Erforderliche Materialien:
F1-Phagen

LB-Medium

Kolonie mit pEMBL-Plasmid o. ä. oder M 13-Phagen

TM-Puffer 10x:

100 mM Tris-HCl pH 8,5

50 mM MgCl₂

5

Chase Lösung:

0,25 mM dNTP-Mix (dATP + dTTP + dGTP + dCTP)

Dideoxy/Deoxy-Mischung:

"C" 20 µM ddCTP, je 37,5 µM dATP, dGTP, dTTP

10

"A" 100 µM ddATP, 5,4 µM dATP, je 54 µM dGTP, dTTP

"G" 100 µM ddGTP, 5,4 µM dGTP, je 54 µM dATP, dTTP

"T" 450 µM ddTTP, 5,4 µM dTTP, je 54 µM dGTP, dATP

alle Mischungen in 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 7,5 mM DTT

15

³⁵S dCTP (500 Ci/mM, 10 mCi/ml)

DNA-Polymerase I großes Fragment (Klenow-Fragment)

Stop-Lösung: Probenpuffer + 10 mM EDTA

M 13-Primer

kleine Mikrotiterplatten

TE-Puffer

20

PEG-Lösung 20% + 14,6% NaCl

Phenol mit Tris-HCl 10 mM pH 9 equilibriert

Chloroform

LiCl 4 M

Ethanol

25

Durchführung

a) Herstellung des Templates

30

1 Tag:

- 1 ml LB-Medium + Antibiotikum mit einer Kolonie animpfen
- bei 37° ON inkubieren

2 Tag:

35

- 3 ml LB-Medium + Antibiotikum mit 100 µl ON-Kultur animpfen
- bei 37° bis OD 600 = 0,2 wachsen lassen (= 2 × 10⁸ Bakt./ml) ca. 60 min
- mit F 1-Phagen infizieren mit 20 pfu/Bakt.
- bei 37° inkubieren 5–6 Std.
- in zwei große Eppendorf transferieren
- zentrifugieren 10 min bei 14 000 rpm
- Überstand in frische Eppendorf transferieren
- zentrifugieren wie oben
- ein Eppendorf zur Reserve bei 4° aufheben
- in zweites Eppendorf (1,1–1,2 ml) 150 µl 20% PEG, 14,6% NaCl zugeben
- 10 min bei RT lassen
- 5 min zentrifugieren
- nochmal zentrifugieren und Überstand gründlich abheben
- Pellet in 200 µl TE aufnehmen
- 60 min bei RT lassen
- Phenol (pH 9) extrahieren 1 x
- Chloroform extrahieren 1 x
- zugeben 1/10 Vol. LiCl 4 M + 2,5 Vol. EtOH
- bei -20° ON lassen

40

45

50

55

3 Tag:

- zentrifugieren 10 min 14 000 rpm
- Pellet mit 70% EtOH waschen
- 10 min in Speed Vac trocknen
- Pellet in 30 µl H₂O aufnehmen
- 1 µl auf Agarose-Gel kontrollieren
- bei -20° aufheben

60

65

OS 37 22 958

b) Annealing des Templates

- 7,5 µl Template in Eppendorf geben
- 5 µl M 13 Primer-Mix zugeben (24 µl TM + 24 µl = 6 ng Primer + 21,6 µl H₂O)
- bei 60° 60 min annealen lassen
- auf RT abkühlen lassen

c) Sequenzierreaktion

- in kleiner Mikrotiterplatte vorbereiten: 4 x je 2 µl "A" bzw. "C" bzw. "G" bzw. "T" Mix
- folgende Mischung herstellen:
 - 10 µl Annealing-Reaktion
 - + 2,5 µl ³²S dCTP
 - + 2 µl Klenow-Fragment (5 U/µl)
- gut mischen
- jeweils 3 µl dieser Mischung in die Mikrotiterplatte geben
- bei 37° 20 min inkubieren
- je 2 µl Chase Lösung zugeben
- bei 37° 20 min lassen
- je 4 µl Stop-Puffer zugeben
- bei 95° 2 min lassen
- davon 2,5 µl auf Sequenziergel laden.

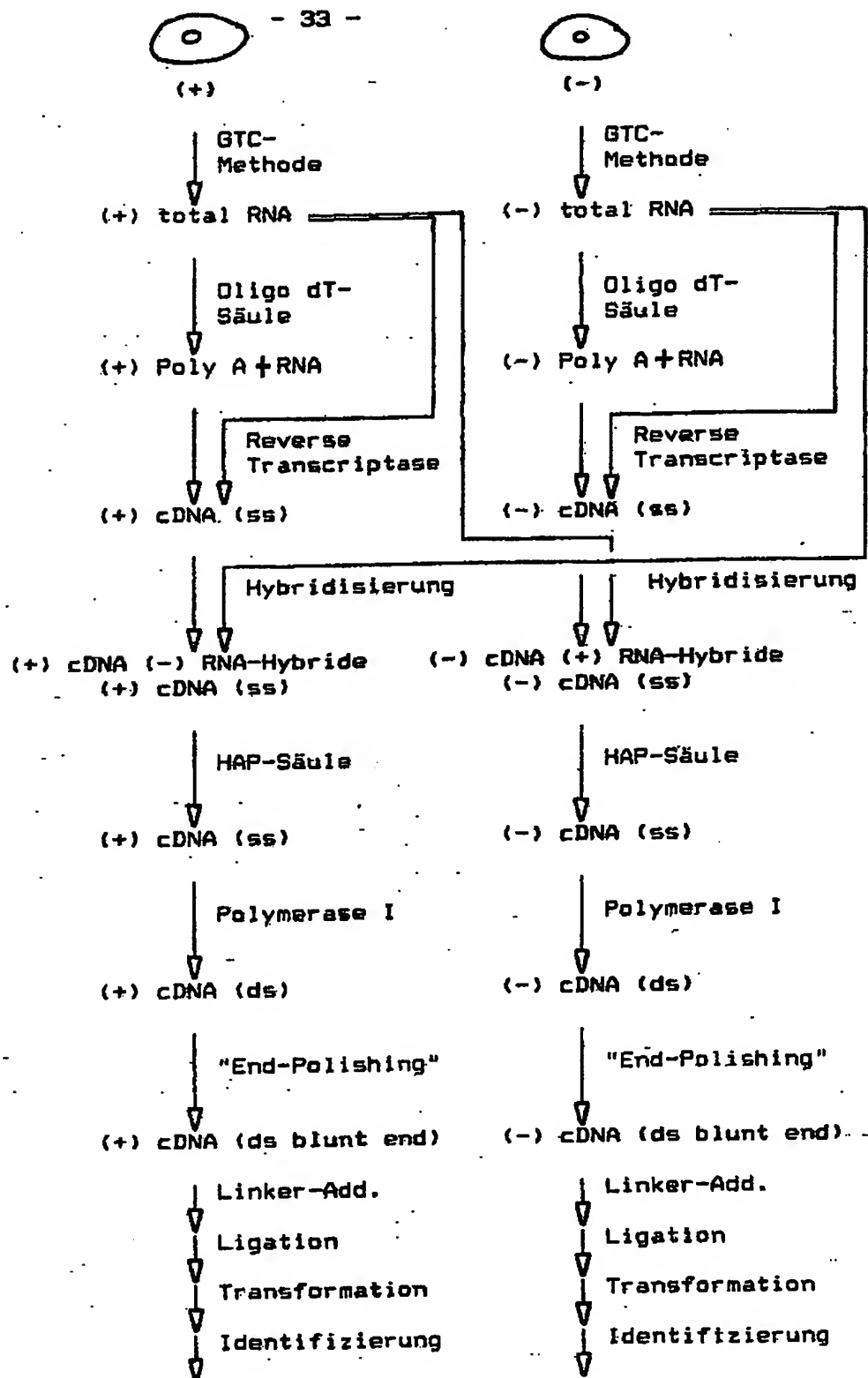
- Leerseite -

3722958

Number:
Int. Cl. 4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

34 13
37 22 958
C 12 P 21/00
11. Juli 1987
19. Januar 1989

34

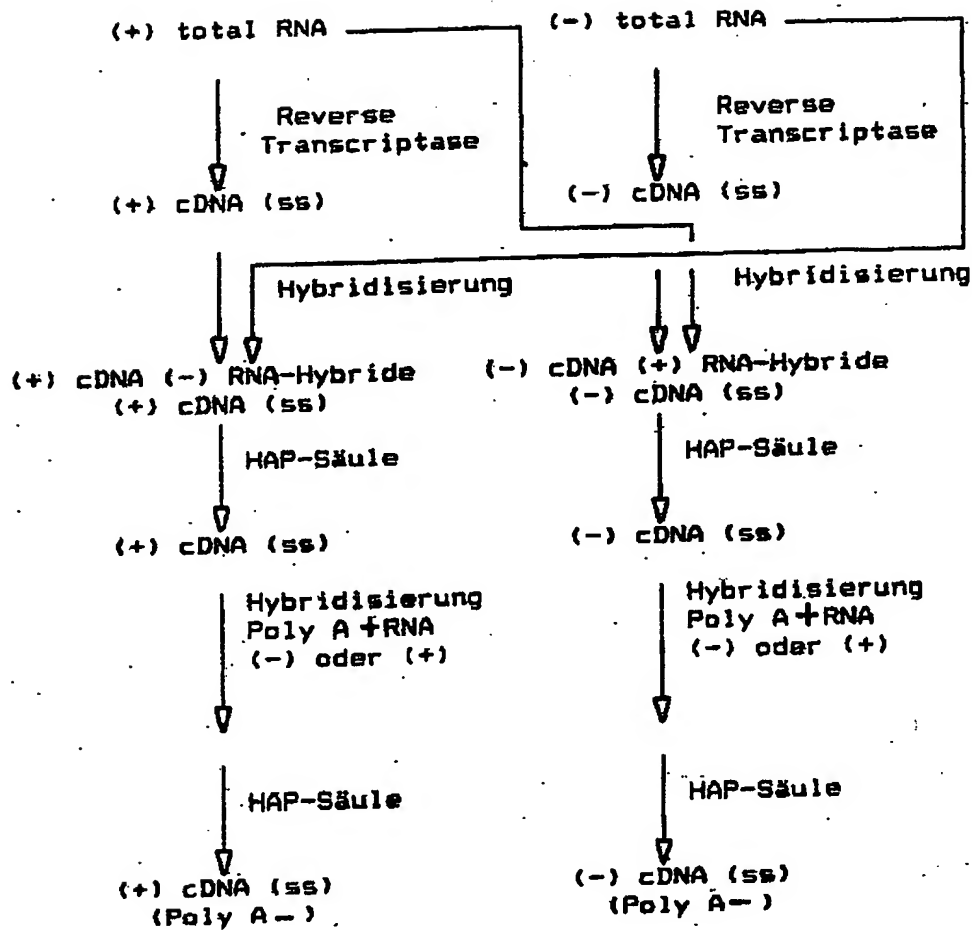


FIGUR 1

110387

- 34 -

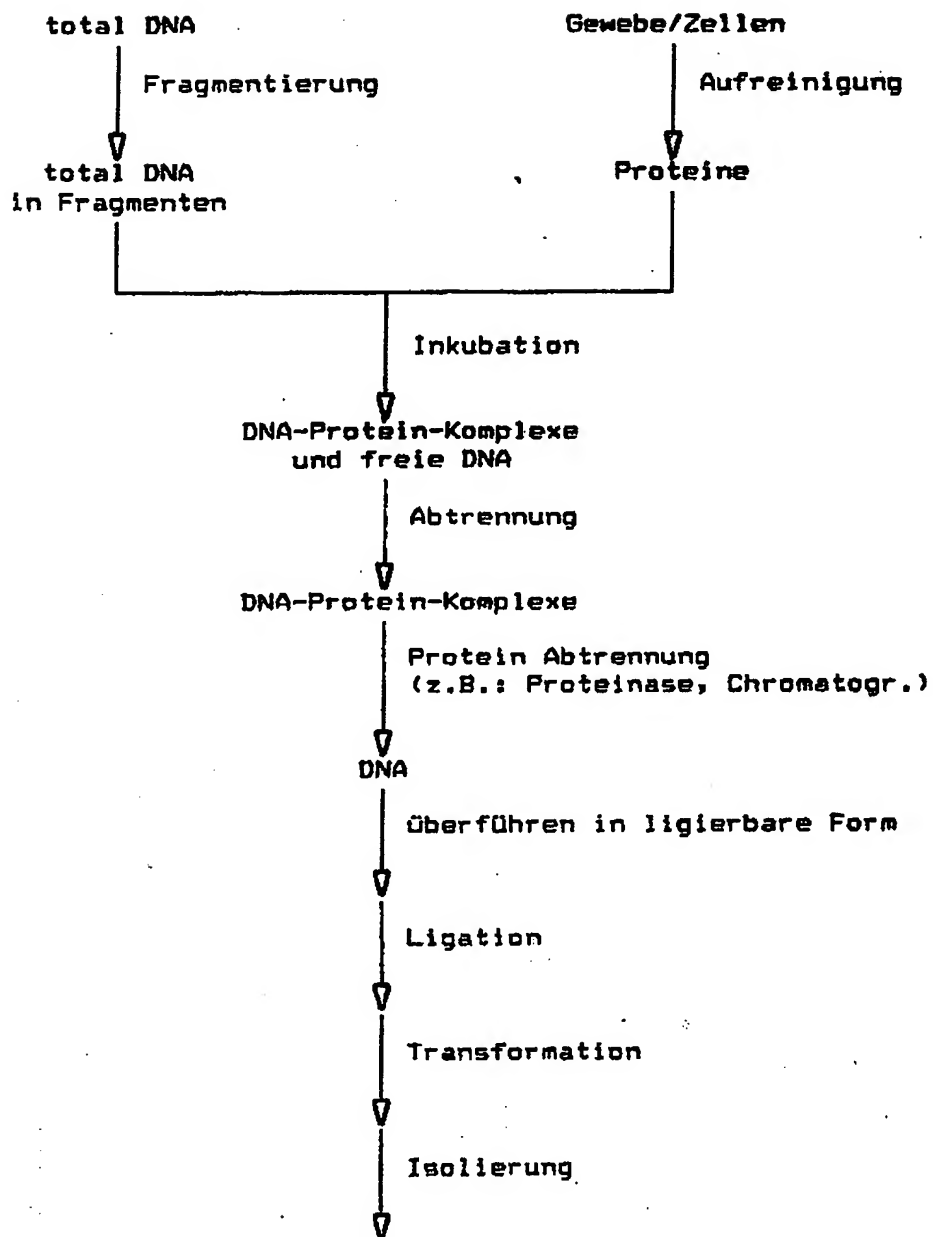
3722958



FIGUR 2

- 35 -

3722958



FIGUR 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.